

用高效液相谱仪分离人精浆中睾酮与双氢睾酮

杨惠钟 缪钟瑞 贺知行 姜 苏 曾福祥

(四川省计划生育科研究所,成都)

提 要

我们建立了用高效液相谱仪分离人精浆中睾酮(T)和双氢睾酮(DHT)的方法。分离柱是 Partisil 5 ODS 3, 流动相是甲醇和水(4:1), 流速 1.5ml/min, 用荧光检测器监测“DHT”的保留时间, 用 T 与 DHT 的 ^3H 标记物测得回收率分别为 96.4% 与 96.5%, 分离一个样品约需 12—14 分钟, 分离了 600 份精浆样品, 经放射免疫测定得到满意结果。

精浆睾酮与双氢睾酮的分离一般采用 Cel-lite 柱层法, 但该方法有不少缺点。近几年来越来越多的人采用高效液相技术来分离甾体激素, 然后将分离得到的激素作放射免疫测定。Cochran 等^[1]及 Satyaswaroop 等^[2]曾用高效液相技术分离了包括睾酮与双氢睾酮在内的十几种甾体激素, 但用这种技术来分离人精浆中睾酮与双氢睾酮迄今未见报道。我们建立了用高效液相技术分离人精浆中睾酮与双氢睾酮的方法, 然后将分离得到的睾酮与双氢睾酮进行放射免疫测定, 得到满意结果。

材 料 与 方 法

1. 装置

Gilson 高效液相谱仪(HPLC), 带有微机(Apple IIe)控制及数据处理系统, 紫外检测器(Holchrom), 荧光检测器(121), 馏份收集器(201)(法国 Gilson 公司)。柱用 Partisil 5 ODS 3, 250 × 4.6mm (Whatman 公司)。

^3H 标记物测量用 3801 液闪谱仪(Beckman 公司)

2. 化学试剂

甲醇: A. R. 经重蒸; 水: 新鲜双蒸水; 睾酮纯品: 英国 The British Drug Houses 公司;

^3H -T: WHO 提供; ^3H -DHT: 意大利 RADIM S. P. A 公司; 放射免疫药箱: WHO 提供。

3. 精浆及前处理

精液经 2500—3000rpm 离心分离得到精浆置于 -70℃ 冰箱中备用。冰冻精浆化冻后用乙醚抽提, 减压蒸馏, 用 400 μl 甲醇流动相溶解, 取 250 μl 进样。

4. 样品分离

以甲醇和水(4:1)作流动相, 流速为 1.5ml/min, 用 250 μl 进样环, 每次进样 250 μl , 温度控制在 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 睾酮的保留时间为 $4.95 \pm 0.15\text{min}$, 双氢睾酮的保留时间为 $6.15 \pm 0.15\text{min}$, 用荧光检测器保证“双氢睾酮”的保留时间, 用馏份收集器收集睾酮 1.2min (从 4.5 至 5.6min), 双氢睾酮 1.2min (从 5.7 至 6.8min)。然后用冻干机冻干, 送交放射免疫测定。

结 果

1. T 与 DHT 的分离实验

试验过程中发现一物质 X 在 HPLC 行为与 DHT 基本一致, 该物质用紫外与荧光检测器均能检出, 而且均只有一个峰, 只是荧光灵敏得多, 我们就用 X 来指示 DHT 的行为。将 X 加到配成 0.2 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ 浓度的 T 纯品溶液中,

取 250 μ l 进样,考虑到分离要好,又要缩短分离时间,最后确定分离条件是: 流动相是甲醇和水(4:1)流速 1.5ml/min, 室温 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 按拟定条件实验,得到色谱图 1。

用 $^3\text{H-T}$ 和 $^3\text{H-DHT}$ 以上述条件作分离实验,结果见图 2。

图 1 与图 2 结果基本一致。

2. 用 $^3\text{H-T}$ 与 $^3\text{H-DHT}$ 作回收率试验

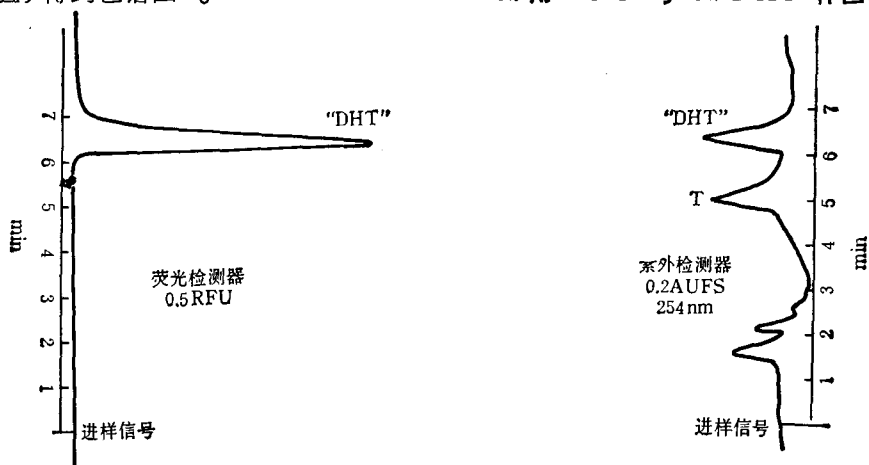


图 1 睾酮与“双氢睾酮”的分离

表 1 T 与 DHT 的回收率

编号	加入量 (cpm)		测得量 (cpm)		回收率 (%)	
	T	DHT	T	DHT	T	DHT
1	13562	3112	13041	2929	96.2	94.1
2	13562	3112	13051	3073	96.2	97.5
3	13562	3112	13210	3175	97.4	102.0
4	13562	3112	12808	2900	94.4	93.2
5	13562	3112	13333	3060	98.3	98.3
6	13562	3112	12816	2898	94.5	93.1
7	13562	3112	13292	3028	98.0	97.3
注: 平均值 ($\bar{x}$).					96.4	96.6
标准差 (SD).					± 1.57	± 3.20

表 2 各种分离方法放射免疫测定结果比较

文献	T (n mol/L)		DHT (n mol/L)		方法
	平均值	范围或 $\pm SD$	平均值	范围或 $\pm SD$	
本法	0.77	0.71—0.83	0.90	0.85—0.95	(HPLC)
[3]	0.61	0.21—1.76	1.27	0.49—3.48	(Celite)
[4]	0.98	0.71—1.3	0.77	0.56—1.0	(Celite)
[5]	0.89	0.26—2.15	1.06	0.72—1.91	Sephadex LH-20, TLC
[6]	2.08	± 1.60	2.46	± 2.41	(TLC)
[7]	0.69	± 0.059	1.47	± 0.148	(氧化法)

* 95% 置信区限。

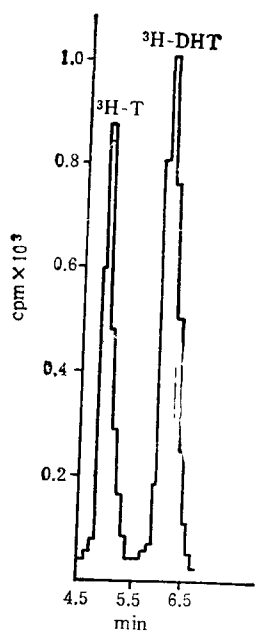


图2 $^3\text{H-T}$ 和 $^3\text{H-DHT}$ 分离色谱图

用 $^3\text{H-T}$ 和 $^3\text{H-DHT}$ 以上述条件作回收率试验, $^3\text{H-T}$ 与 $^3\text{H-DHT}$ 混合物进样体积为 $10\mu\text{l}$ (用 $20\mu\text{l}$ 进样环), 按拟定收集时间收集于加有闪烁液的闪烁瓶内, 放置过夜测量。结果见表 1。

由表 1 可见结果是令人满意的。

3. 用 $^3\text{H-T}$ 与 $^3\text{H-DHT}$ 加到精浆样品中作回收率试验

取 0.5ml 精浆, 加入 $^3\text{H-T}$ 与 $^3\text{H-DHT}$ (分别为 3005cpm 和 1322cpm), 经乙醚抽提后按拟定程序操作, 取出一部分分离物测量放射性, 结果为: T 的 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 是 $97.5 \pm 14.2\%$ ($n=47$), DHT 的 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 是 $91.5 \pm 12.7\%$ ($n=47$)。

4. 用前面试验确定条件分离人精浆样品 600 余份, 经放射免疫测定, 得到满意结果, 结果见表 2。

讨 论

1. 人精浆中 T 与 DHT 含量很低 (10^{-10} —

10^{-11}g/ml), 这只能采用分析系统来制备。而精浆的乙醚抽提物又不能用太少的甲醇溶液溶解, 最后我们采用 $400\mu\text{l}$ 80% 甲醇溶解。

2. 在我们实验条件下, 如用部分进样法保留时间漂移较大, 故我们采用全进样法 (即用 $250\mu\text{l}$), 进样环进样 $250\mu\text{l}$), 使保留时间基本保持稳定。

3. 由于人精浆中 T 与 DHT 浓度很低, 紫外检测器无法检测 T ; 而 DHT 对紫外与荧光均不敏感。虽然可以由 T 与 DHT 的 ^3H 标记物来确定分离条件, 并应用于实际样品的分离, 但缺乏直观的检测, 实验条件便很难保证, 特别我们的样品数量很大, 时间拖得很长。我们发现了 x (这是一种什么物质, 我们还未搞清楚), 在 HPLC 的行为与 DHT 的基本一致, 但对放射免疫测定完全无影响。我们就把 x 作为 DHT 的指示剂, 由于它对荧光非常敏感, 我们便采用荧光检测器。在实际样品分离前, 就用 x 来检查 HPLC 是否正常。从 600 余份人精浆样品的分离看, x 指示剂还是非常需要的。从 H-T 与 $^3\text{H-DHT}$ 的示踪和回收率, 实际样品的放免测定结果来看本方法是令人满意的。

参 考 文 献

- [1] Cochran, R. C.: *J. Chromatogr.*, 1979, **173**, 175.
- [2] Satyaswaroop, P. G.: *Steroids*, 1977, **30**, 139.
- [3] Purvis, K.: *Clinical Endocrinology*, 1975, **4**, 247.
- [4] Wang Ying: *International J. Andrology*, 1983, **6**, 116.
- [5] Pazzagli, M.: *Clinical Endocrinology*, 1979, **11**, 11.
- [6] Aloysio, D. D.: *Acta Eur. Fert.*, 1978, **9**, 139.
- [7] Lannou, D. L.: *International J. Andrology*, 1980, **3**, 502.

[本文于 1987 年 7 月 6 日收到]